

**DER EINFLUSS EINER UNTERSCHWELLIGEN
KONZENTRATION VON DIHYDROSTREPTOMYCIN
AUF DIE MAKROPHAGENPHAGOZYTOSE
VON ESCHERICHIA COLI 018**

Fritz Staber

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554604_0036

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. K. Betke

DER EINFLUSS EINER UNTERSCHWELLIGEN KONZENTRATION VON
DIHYDROSTREPTOMYCIN AUF DIE MAKROPHAGENPHAGOZYTOSE
VON ESCHERICHIA COLI 018

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Fritz Staber

aus
München

Jahr
1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer.nat. D. Adam

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 1973



I. Einleitung: Bereits auf einer phylogenetisch sehr frühen Stufe entwickelten die Lebewesen zur Erhaltung ihrer Individualität ein System, das ihnen gestattet zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen zu unterscheiden. So gelang es zum Beispiel schon bei den Meeresneunaugen (*Petromyzon marinus*) eine Antikörperbildung gegen gewisse Antigene zu induzieren (1). Im Verlauf der Phylogenese entwickelte sich daraus das hochdifferenzierte Immunsystem, dem unter anderem auch die Infektabwehr zukommt.

Der Mensch besitzt zahlreiche Immunmechanismen, die darauf ausgerichtet sind ihn vor Mikroorganismen zu schützen. Sie lassen sich nach verschiedenen Gesichtspunkten einteilen (2,3). Gebräuchlich ist zum Beispiel die Gliederung in humorale Faktoren (spezifische Antikörper, Komplement, Properdin, Lysozym und Interferon) und zelluläre (Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und polymorphkernige Granulozyten). Wichtig ist auch die Gliederung in ein unspezifisches (Komplement, Lysozym, Properdin und polymorphkernige Granulozyten) und ein spezifisches Abwehrsystem (Antikörper und Lymphozyten).

Dem Arzt steht mit den modernen Chemotherapeutika auch eine medikamentöse Hilfe für die Infektabwehr zur Verfügung. Bereits bei der Sulfonamidbehandlung wurde die Erfahrung gemacht, daß zwischen der in-vitro und der in-vivo Wirksamkeit von Chemotherapeutika eine erhebliche Diskrepanz bestehen kann. Auch bei der Antibiotikatherapie sind solche Widersprüche bekannt (4). Das Hauptmißverständnis ist wohl darin zu suchen, daß die in-vitro Hemmkonzentrationen zu erreichbaren intravasalen Antibiotikaspiegeln in Relation gesetzt wurden, obwohl in den meisten Fällen eine chemotherapeutische Wirkung erst durch die Diffusion ins Gewebe ermöglicht wird. Die Gewebekonzentrationen können aber unter Umständen nur Bruchteile dieser erwähnten Blutspiegelkonzentrationen ausmachen (5). Trotzdem zeigt die Er-

fahrung, daß aber sogar minimale Blutkonzentrationen zu einem therapeutischen Erfolg führen können (6). Dieses Phänomen läßt sich theoretisch durch zwei Möglichkeiten erklären.

1. Der Körper verfügt über einen Mechanismus, der die Wirkung des Antibiotikums verstärkt.

2. Das Antibiotikum verstärkt die körpereigene Abwehr.

Bisher wurden Chemotherapie und körpereigene Infektabwehr meistens getrennt betrachtet. Die geschilderten Tatsachen veranlassen uns anzunehmen, daß zwischen den beiden ein Zusammenwirken besteht. So ist es zum Beispiel möglich durch subbakteriostatische Mengen von Polymyxin oder Gentamycin die natürliche Bakterizidie von normalen Humanserum in-vitro zu erhöhen (7). Das entscheidende biologische Phänomen bei der Vernichtung von Bakterien ist neben der Serumbakterizidie die Phagozytose, die schon um die Jahrhundertwende von Metschnikoff entdeckt und beschrieben wurde (8,9). Dem Zusammenspiel von Phagozytose und Chemotherapie haben wir deshalb in unseren Untersuchungen besondere Beachtung geschenkt.

In diesem Zusammenhang erschienen uns die Makrophagen von besonderem Interesse, denn außer der wichtigen Abräumfunktion, die sie mit den neutrophilen Granulozyten gemeinsam haben, kommt ihnen zusätzlich bei der spezifischen körpereigenen Abwehr eine entscheidende Bedeutung zu. Sie sind im Hinblick auf die Antikörperbildung die wichtigsten phagozytierenden Zellen. Ihre Funktion ist aber keineswegs auf die Phagozytose beschränkt, sondern sie modifizieren und verarbeiten das Antigen, um dann eine entsprechende Information an die antikörperbildenden Zellen weiterzugeben. Dieses wurde durch zahlreiche Untersuchungen gezeigt.

So wurden zum Beispiel von Fishman und Adler (10) 5×10^6 plaquebildende Einheiten T_2 -Bakteriophagen als Antigen mit einer

Suspension von 10^9 Peritonealmakrophagen von Ratten gemischt. Nach 30 Minuten wurden die Makrophagen abzentrifugiert, gewaschen, homogenisiert und intakte Zellen mit einem Bakterienfilter entfernt. Aus den Extrakten wurde Ribonukleinsäure isoliert und im Saccharosedichtegradienten zentrifugiert. Fraktionen aus den oberen, mittleren und unteren Schichten des Gradienten wurden jeweils mit Lymphknoten von Ratten gemischt und in Millipore Diffusionskammern in die Bauchhöhle bestrahlter Ratten eingepflanzt. 4 Tage später wurde das Serum der Ratten auf den Gehalt an Antikörpern, die T_2 -Phagen neutralisieren untersucht.

Die Resultate sind in Tabelle 1 abgebildet. Nichtfraktionierte und aus der oberen Schicht des Gradienten stammende RNS von Makrophagen, die mit T_2 -Phagen inkubiert worden waren, induzierte die Bildung neutralisierender Antikörper, nicht aber RNS von Makrophagen, die nicht mit T_2 -Phagen in Kontakt gebracht worden waren. Die Fähigkeit der RNS die Bildung von Antikörpern zu stimulieren, wurde durch Ribonuclease zerstört.

In einer weiteren Studie (11), mit Kaninchen bekannter Allotypen, wurde aus Peritonealmakrophagen, die zuvor 30 Minuten mit T_2 -Bakteriophagen inkubiert worden waren, RNS isoliert und zu Kulturen von Lymphknotenfragmenten von Kaninchen eines anderen Allotyps gegeben. Die in den ersten Tagen produzierten IgM-Antikörper waren vom Spenderallotyp, während die später produzierten IgG-Antikörper dem Empfängertyp angehörten. Die in diesem Versuch verwendeten, genetisch determinierten allotypischen Marker waren sowohl bei den Spender- als auch bei den Empfängertieren auf den L-Ketten der Immunglobuline lokalisiert.

Das Ergebnis dieses Versuches ist insofern wichtig, weil von verschiedenen Seiten versucht wurde, die immunogene Wirkung der Makrophagen-RNS auf Verunreinigungen mit dem Antigen zurückzuführen. Es ist aber schwer einzusehen, wie das Antigen

Implantiertes Material	RNS (μ g)	Zahl der Ratten, die nach 4 Tagen Anti-T ₂ im Serum besitzen ^a / Gesamtzahl der untersuchten Tiere
Lymphknotenzellen + RNS (M-T ₂) ^b	150	8/13
Lymphknotenzellen + RNS (M-T ₂) obere Schicht	190	4/8
Lymphknotenzellen + RNS (M-T ₂) mittlere Schicht	360	1/8
Lymphknotenzellen + RNS (M-T ₂) mittlere Schicht	180	0/9
Lymphknotenzellen + RNS (M-T ₂) untere Schicht	150	0/12
Lymphknotenzellen + RNS (M-T ₂) + RNase	150	0/14
Lymphknotenzellen + RNS (M)	200	0/9

Tabelle 1. Bildung von Serumantikörpern gegen T₂-Bakteriophagen in bestrahlten Ratten, denen Diffusionskammern eingepflanzt wurden, die Lymphknotenzellen und RNS-Fraktionen aus Makrophagen enthielten. (Nach Fishman, M., Adler, F.L.; J. exp. Med. 117, 595 (1963)).

a: Als positives Resultat wurde die Neutralisation von 30% der Bakteriophagentestdosis (500 plaquebildende Einheiten) durch eine 1:4 Verdünnung des Serums gewertet.

b: (M-T₂) = T₂-Phagen inkubierte Makrophagen
(M) = unbehandelte Makrophagen.

allein oder die bloße Verarbeitung des Antigens zu einer immunologisch wirksameren Form gleichzeitig die Synthese der allotypischen Determinanten des Spenders ermöglichen sollte.

Zusammenfassend kann man also feststellen:

1. Makrophagen haben wegen ihrer Abräumfunktion eine große Bedeutung für die unspezifische Infektabwehr.
2. Auch bei der Induktion der spezifischen Antikörpersynthese scheinen Makrophagen eine wichtige Rolle zu spielen.
3. Es bestehen Hinweise dafür, daß zwischen Chemotherapie und körpereigener Abwehr ein Zusammenwirken besteht.

Auf Grund dieser Tatsachen wurde ich beauftragt, den Einfluß einer unterschwelligen Antibiotikakonzentration auf die Makrophagenphagozytose von Bakterien zu untersuchen.

II. Material und Methoden:

a: Versuchstiere: Als Versuchstiere verwendeten wir weibliche Mäuse vom Stamm NMRI mit einem Durchschnittsgewicht von 25-30 gr. Die Tiere wurden mit Altromin^R-15 gefüttert, Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung. Im indirekten Hämagglutinationstest nach Neter (12) wurden die Seren einiger Mäuse auf ihren Antikörpertiter gegen den Testkeim geprüft. Er lag meistens bei $\leq 1:10$.

b: Testkeim: Als Testkeim verwendeten wir *Escherichia coli* 018 der uns freundlicherweise von Dr. Ørskov aus Kopenhagen zur Verfügung gestellt wurde. Vor Benützung wurden einige Kolonien mit einer Platinnadel in 10 ml Brain-Heart-Infusion Broth (Difco) überimpft und 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann wurde die Keimsuspension im selben Medium 1:10 verdünnt, eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und 10 Minuten im Tiefgefrierschrank bei minus 20° abgekühlt, um die Keime in ihrer Vermehrung zu stoppen. Anschließend wurde die Keimsuspension abermals im selben Medium 1:2 verdünnt und in einem Coleman-Spectrophotometer (Model Junior 6/20) auf eine optische Dichte von 0,15 bei 615 m μ m eingestellt. Durch Ausstrichen einer entsprechenden Verdünnung auf Endoplaten und anschließendes Auszählen wurde gezeigt, daß dies einer Konzentration von ungefähr 10⁸ Keimen/ml entsprach.

c: Herstellung von *Escherichia coli* 018 Antigen: *Escherichia coli* wurde über Nacht auf normalen Agarplatten angezüchtet und dann mit einem Wattetupfer und physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Die Keimsuspension wurde zentrifugiert und viermal mittels physiologischer Kochsalzlösung bei 850 g gewaschen. Danach wurde das Sediment wiederum mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zum Abtöten der Keime bei 100°C eine Stunde in ein Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Keime im Coleman-Spectrophotometer auf eine optische Dichte von 0,5 bei 615 m μ m eingestellt. Vor Gebrauch wurde das Antigen auf Sterilität geprüft.

d: Spezifische Kaninchenimmunserum: 10 Kaninchen wurden durch Injektion von 1, 2 und 3 ml Escherichia coli 048 Antigen, je im Abstand von 6 Tagen immunisiert. 6 Tage nach der letzten Injektion wurden den Tieren ca 60 ml Blut steril aus der lateralen Ohrvene entnommen. Bei Bedarf bekamen die Tiere eine einmalige Boosterung durch 5 ml Antigen und wurden wiederum 6 Tage später entblutet. Bei der Herstellung von Serum wurde besonders auf etwaige Hämolyse geachtet, da freies Hämoglobin die Phagozytose hemmen soll (13). Im indirekten Hämagglutinationstest nach Neter (12) war bei allen Seren der Antikörpertiter 1:1520 oder größer.

e: Antibiotikum: Als Antibiotikum verwendeten wir Dihydrostreptomycin (Dhs) der Firma Bayer Ag, Leverkusen, (Batch Nr. III 73 1C). Stammlösungen dieser Substanz wurden bei minus 20°C bis zu ihrer Verwendung eingefroren.

f: Isolierung von Makrophagen: Peritonealmakrophagen von Mäusen wurden nach der Methode von Whitby und Rowley (14) gewonnen. Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet. Nach Abpräparieren der Bauchhaut wurde ihnen je 2 ml Eagle's Minimal essential Medium (Behring-Werke Marburg/Lahn) mit einem Zusatz von 5 I.U. Heparin/ml (Liquemin^R, Hofmann La Roche, Basel) in Höhe der Media linie in die Bauchhöhle injiziert. Einige Sekunden später wurden 1,5 ml wieder lateral punktiert. Unter kontinuierlichem Schütteln, um ein Festhaften der Zellen am Glas zu vermeiden, wurden die Zellsuspensionen von sieben Mäusen gepoolt und 20% inaktiviertes Rinderserum hinzugegeben. Durch Verdünnen mit demselben Medium wurde die Zellzahl auf etwa 3×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Die Angaben über das "weiße Blutbild" im Peritonealexsudat der Maus schwanken (14, 15, 16, 17, 18, 19) Differenzierungen nach den üblichen hämatologisch-morphologischen Kriterien sind unzuverlässig, besonders dürfte es zu Verwechslungen zwischen Makrophagen und mittleren bis großen Lymphozyten kommen. Nach Huber und Fudenberg (20) können Makrophagen nur durch histo-

chemische Methoden oder mittels zytophiler Antikörper eindeutig bestimmt werden. Nach den meisten Autoren sind 80-95% der Zellen im Peritonealexsudat der Maus Makrophagen, Der übrige Teil besteht zum größten Teil aus Lymphozyten und vereinzelt polymorphkernigen Leukozyten. Die einfachste und schonenste Technik die Makrophagen zu isolieren ist die Adhäsionstechnik. Sie geht davon aus, daß nur Granulozyten, Makrophagen und Fibroblasten befähigt sind sich auf Glas festzusetzen. Im Peritonealexsudat der Maus befinden sich keine Fibroblasten, sowie nur wenige Granulozyten, die außerdem unter den in-vitro Bedingungen schnell absterben. Wir verwendeten die Adhäsionsmethode wie sie von Degré (21) angegeben wird, mit einigen Modifikationen. Je ein ml der gepoolten Zellsuspension wurde in einen sterilen Leighton tube (Bellco) gegeben, in dem sich ein Deckgläschen (10,5 x 35mm) befand, das den ganzen Boden des Röhrchens bedeckte (Abbildung 1).

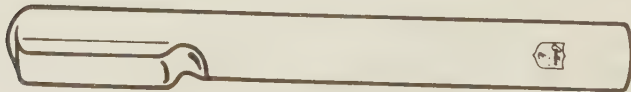


Abbildung 1. Leighton tube (Bellco) für Zellkulturen. Auf der planen Fläche liegt ein Deckgläschen, auf dem die Zellen haften.

Die Röhrchen wurden 18 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Deckgläschen unter aseptischen Bedingungen aus den Leighton tubes genommen, in Eagle's Medium gewaschen und in neue sterile Leighton tubes gegeben, in denen sich Eagle's, Kaninchenimmunserum, Bakterien und eventuell Antibiotikum

befanden (siehe Punkt g). Der Überstand in den Adhäsionsröhrchen wurde gepoolt und die Zellzahl in einer Neubauerkammer bestimmt. Durch Subtraktion der letzteren von der Zellzahl im Peritonealexsudat wurde die Zahl der Zellen auf dem Deckgläschen bestimmt. Im Schnitt hatten sich ca 60% der Zellen auf den Deckgläschen festgesetzt. Diese Zellen sind in ihrer überwiegenden Mehrzahl Makrophagen. Die Verunreinigung mit Granulozyten spielt für unsere Fragestellung keine Rolle.

g: Bestimmung der Phagozytoseaktivität mit und ohne Dihydrostreptomycin: Abbildung zwei zeigt den Aufbau eines Versuchs.

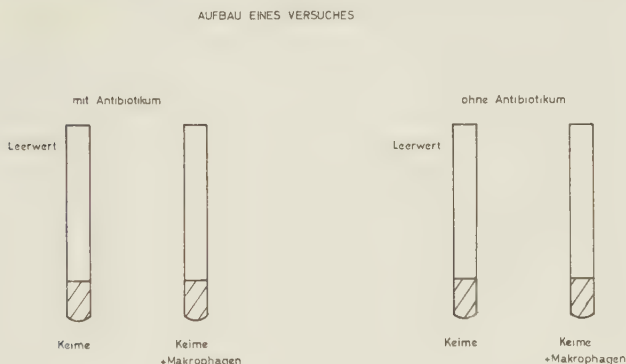


Abbildung 2. Aufbau eines Versuchs. Die Leerwerte enthalten keine Makrophagen.

Die frischen Röhrchen enthielten wiederum Eagle's Minimal essential Medium, dem 20% Kaninchenimmenserum zur Verbesserung der Phagozytose hinzugegeben wurde und ca 10^3 colonyforming units Escherichia coli O18, die aus einem pool stammten, so daß die Keimzahl in allen Röhrchen annähernd gleich groß war. Ein Teil der Röhrchen enthielt Dhs in einer in Vorversuchen er-

mittelten unterschwelligen* Konzentration (0,3 mcg/ml), ein Teil der Röhrchen enthielt kein Antibiotikum. Das Gesamtvolumen in jedem Röhrchen betrug 1 ml.

Durch die Hinzugabe des Antibiotikums trat kein Verdünnungseffekt des Mediums auf. Zu jedem Testansatz wurde ein Leerwert ohne Makrophagen angesetzt. Jeder Versuch wurde mit Dreifachkontrollen durchgeführt, so daß er sich aus insgesamt 6 Teströhrchen (3 mit Dhs, 3 ohne Antibiotikum) und 6 Leerwerten zusammensetzte. Der pH wurde mit Bikarbonat auf 7,3 eingestellt und die Röhrchen 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie in ein Eisbad gebracht und von allen Röhrchen durch Entnahme eines Aliquots eine Keimzählung vorgenommen, wobei je 0,1 ml Bakteriensuspension gleichmäßig auf Endoplatten verstrichen wurden. Die Deckgläschen wurden aseptisch entnommen, dreimal in steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen um lediglich außen anhaftende Keime zu entfernen und umgekehrt auf eine Endoplatte gelegt. Mit Hilfe einer sterilen Platinöse wurden sie dann kräftig über den Agar gezogen um die Makrophagen zu zerstören (21). Die Keimzahldifferenzen zwischen den Teströhrchen und den Leerwerten sind durch Phagozytose verursacht. Die Keime, die von den Deckgläschen isoliert und auf Platten angezüchtet wurden sind phagozytierte aber noch lebende Bakterien. Durch Subtraktion der letzteren von der Gesamtheit aller phagozytierten Keime kann man die nach der Phagozytose intrazellulär abgetöteten Bakterien berechnen. Obwohl die Bestimmung der intrazellulären Keime relativ ungenau ist, konnten wie später gezeigt wird, doch statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden.

Zunächst wurden mit dieser Versuchsanordnung sehr unbefriedigende Ergebnisse erhalten, weil die Makrophagen sowohl mit als auch ohne Antibiotikum sehr schlecht phagozytierten. Dies veranlaßte uns einige methodische Änderungen vorzunehmen. Durch viability-tests mit Trypanblau (22) konnte gezeigt werden, daß nach einer Adhäsionszeit von 18 Stunden über 60% der Makrophagen auf den Deckgläschen abgestorben waren. Die Adhäsionszeit wurde *

Unter unterschwelliger Konzentration verstehen wir diejenige, die in unserer Versuchsanordnung hinsichtlich einer Wachstumshemmung gerade noch keine Wirkung zeigt.

daher auf 3 1/2 Stunden verkürzt. Zu diesem Zeitpunkt waren etwa 50% der Zellen des Peritonealexsudats auf dem Deckgläschen, die praktisch alle noch lebten. Weiterhin erwies es sich als vorteilhaft die Phagozytosezeit von 60 auf 90 Minuten zu verlängern. Auch machten wir die Erfahrung, daß die Makrophagen bei einem pH von 6,2 - 6,3 wesentlich besser phagozytierten als bei einem pH von 7,3, was mit den Ergebnissen von Beck und Bergner-Rabinowitz (22) übereinstimmt, die zeigen konnten, daß der physiologische pH der Peritonealhöhle der Maus im Bereich von 6,1 - 6,3 liegt. Da das Wirkungsoptimum Dhs bei pH 7,5 - 8 liegt und das Antibiotikum bei einem pH von 6,0 zu 90% inaktiviert ist (23) wählten wir einen Kompromiß und stellten den pH mittels einer je 1%igen Lösung von Citronensäure und Milchsäure im Verhältnis 1:1 auf 6,5 ein (22). Auch stellte sich heraus, daß Makrophagen in Röhrchen, die mit Chromschwefelsäure gereinigt wurden besser phagozytierten, als solche, die nur mit quarternären Ammoniumbasen gesäubert wurden. Dies ist wohl dadurch zu erklären, daß die quarternären Ammoniumbasen Makrophagen, die sich bei vorhergehenden Versuchen an der Glaswand festgesetzt haben, nicht eluieren können und diese Makrophagen bei einer anschließenden Sterilisation verkohlen, wobei toxische Stoffwechselprodukte entstehen dürften. Zu erwähnen ist noch, daß die subinhibitorische Konzentration eines Antibiotikums in dieser Versuchsanordnung keine konstante Größe darstellt, sondern sich reziprok zur Einwirkungszeit verhält. Deshalb wurden die Keime konstant 30 Minuten vor Beginn der Phagozytose mit dem Antibiotikum inkubiert und zwar bei 0°C um eine Vermehrung der Keime zu verhindern. Anschließend wurden die Röhrchen 30 sek im Wasserbad bei 37°C erwärmt und erst dann, um die Makrophagen nicht zu schädigen, die Deckgläschen mit den Makrophagen hinzugegeben. Während der anschließenden Phagozytosezeit von 90 Minuten änderte sich in den Leerwerten die Keimzahl nicht, das heißt, es starben weder Keime, noch fand eine Proliferation statt, da die Phagozytosezeit kürzer als die lag-Phase (120 Minuten) der Bakterienpopulation war. Also war auch von dieser Seite keine Beeinträchtigung der Quantität der Ergebnisse zu erwarten. Vor Entnahme des Aliquots zur Bestimmung der Keimzahl

in den einzelnen Röhrchen wurden diese 30 Sekunden auf einen Rüttler gestellt um eine Disaggregation eventuell verklumpter Keime zu erreichen.

III. Ergebnisse:

Es konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

a: Phagozytose: Es wurden insgesamt 80 Versuche durchgeführt. Die ersten 65 konnten aufgrund der geschilderten methodischen Mängel nicht ausgewertet werden. Nach Einführung der beschriebenen Verbesserungen konnte in den 15 darauffolgenden Versuchen in allen ein gleichartiges Ergebnis erzielt werden.

	L	T	L - T	$\frac{L-T}{L} \times 100$	CS	$\frac{CS}{L-T} \times 100$
ohne Anti-biotikum	3230	2820	410	13 %	262	64 %
mit Anti-biotikum	3700	2440	1260	34 %	207	16 %

Tabelle 2. Ergebnisse und Auswertung eines Versuchs.

L = Leerwert

T = Testwert

CS = cover slip

Tabelle 2 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuchs: In der Spalte L stehen die Keimzahlen der Leerwerte ohne Makrophagen, In der Spalte T die Keimzahlen der Testwerte mit Makrophagen. Die obere Reihe zeigt die Keimzahlen in den Röhrchen ohne Anti-

biotikum, die untere die Keimzahlen der Röhrchen mit Antibiotikum, wobei jeder Wert das arithmetische Mittel von Dreifachkontrollen darstellt. Durch Subtraktion (L-T) wurden die jeweils phagozytierten Keime bestimmt. Die nächste Spalte zeigt die Phagozytose in Prozent bezogen auf die Keimzahl in den Leerwerten. Die Spalte CS (cover slip = Deckgläschen) zeigt die phagozytierten aber noch lebenden Keime, wiederum das arithmetische Mittel der Dreifachkontrolle. Die letzte Spalte zeigt die phagozytierten aber noch lebenden Keime in Prozent, bezogen auf alle phagozytierten Keime.

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse aller 15 Versuche.

	L	T	L - T	$\frac{L-T}{L} \times 100$	CS	$\frac{CS}{L-T} \times 100$
o. AB	2420	1820	600	25%	/	/
m. AB	2120	1170	950	45%	/	/
o. AB	2960	2600	1160	29%	433	37%
m. AB	2910	1550	1360	47%	330	24%
o. AB	3360	2940	420	12%	325	77%
m. AB	2650	1990	660	25%	282	43%
o. AB	3080	3570	/	/	208	100%
m. AB	3060	2790	270	9%	251	96%
o. AB	2730	2280	450	16%	295	66%
m. AB	990	770	220	22%	127	58%
o. AB	3450	2670	780	23%	/	/
m. AB	883	540	343	39%	/	/
o. AB	1590	1120	470	30%	240	51%
m. AB	2400	1330	850	46%	243	24%
o. AB	1550	1170	280	25%	230	61%
m. AB	3250	1450	1800	55%	261	15%
o. AB	3230	2820	410	13%	262	64%
m. AB	3700	2440	1260	34%	207	16%
o. AB	3210	2300	910	29%	206	23%
m. AB	3460	2020	1440	42%	310	21%
o. AB	2810	1830	980	34%	514	52%
m. AB	3620	1610	2010	55%	382	19%
o. AB	3500	1540	1960	56%	383	20%
m. AB	4310	1600	2710	63%	295	11%
o. AB	1110	950	160	14%	113	72%
m. AB	823	793	500	64%	50	9%
o. AB	1120	880	240	21%	64	26%
m. AB	1180	310	870	73%	34	3%
o. AB	1780	1390	390	21%	199	51%
m. AB	2090	1370	720	34%	185	25%

Tabelle 3. Zusammenfassung aller Versuche.

o. AB = ohne Antibiotikum

m. AB = mit Antibiotikum

Abbildung 3 zeigt die prozentualen Werte in graphischer Form. Die weißen Säulen stellen die Phagozytose ohne Dhs dar, die grauen Säulen zeigen die Phagozytose mit Dhs.

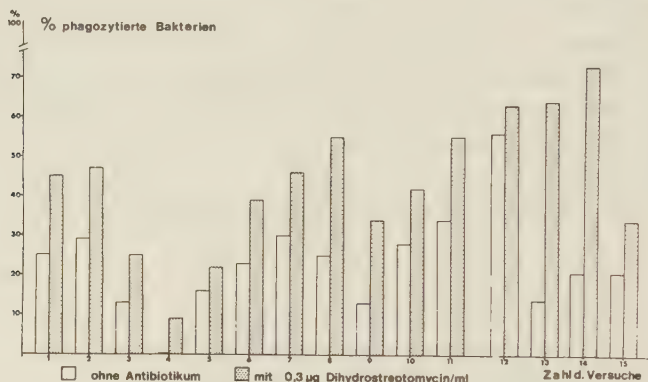


Abbildung 3. Phagozytose von *Escherichia coli* O18 durch Peritonealmakrophagen der Maus mit und ohne Antibiotikum.

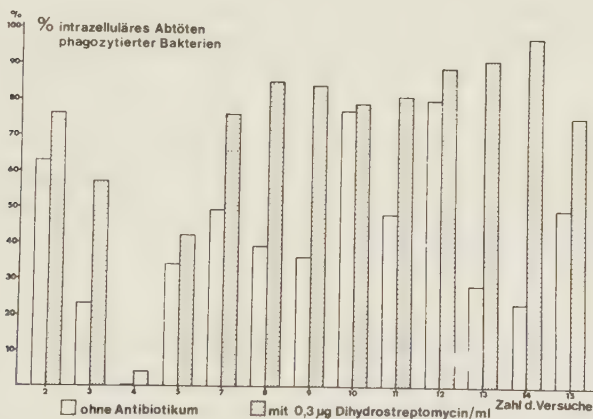
Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) für den verwendeten Stamm beträgt 20 mcg Dhs/ml. Das heißt die von uns verwendete Konzentration von 0,3 mcg/ml ist eine eindeutig unterschwellige Konzentration. Dementsprechend war bei Testende in den Leerwerten ohne Makrophagen die Keimzahl in den Röhrcchen mit Antibiotikum nicht kleiner als in den Röhrcchen ohne Antibiotikum.

Zur Beantwortung der Frage, ob sich die Phagozytose mit und ohne Antibiotikum unterscheidet, wurde der t-Test für verbundene Stichproben herangezogen (Einseitige Fragestellung). Die statistische Beratung erfolgte durch Herrn Dipl.-Math. Albrecht Neiß vom Institut für Medizinische Statistik, Dokumentation

* Die MIC von Dhs gegen *E.coli* O18 wurde im Reihenverdünnungstest ermittelt.

und Datenverarbeitung der Technischen Universität München. Die Berechnung wurde mit absoluten Zahlen, nicht mit den Prozentwerten durchgeführt und ergab einen t-Wert von 3,74. Der kritische t-Wert bei 14-Freiheitsgraden und einer Irrtumswahrscheinlichkeit p 0,025 beträgt 2,15 (24). Daraus folgt, daß zwischen der Phagozytose mit und ohne Antibiotikum ein signifikanter Unterschied besteht.

b: Intrazelluläres Abtöten phagozytierter Keime: Manche Keime (obligat extrazelluläre) werden in Abhängigkeit von Zeit und Virulenz intrazellulär abgetötet (16). Keime, die unter dem Einfluß einer unterschwelligen Konzentration von Dhs phagozytiert wurden, werden zu einem höheren Prozentsatz abgetötet als solche die ohne Dhs phagozytiert wurden. Die Ergebnisse der einzelnen versuche zeigt Abbildung 4. Zwei Versuche konnten nicht ausgewertet werden.



Abbildungung 4. Der Einfluß von Dihydrostreptomycin auf das intrazelluläre Abtöten von Escherichia coli 018 durch Mäusemakrophagen in-vitro.

Zur Beantwortung der Frage, ob die unter dem Einfluß von Dhs phagozytierten Keime einem vermehrten intrazellulären Abbau unterliegen wurde der χ^2 -Test benützt. Die Berechnung ergab folgende χ^2 -Werte:

Versuch 2:	49,9	Versuch 10:	0,3
Versuch 3:	123,7	Versuch 11:	43,7
Versuch 4:	13,5	Versuch 12:	68,0
Versuch 5:	3,6	Versuch 13:	260,0
Versuch 6:	51,1	Versuch 14:	116,1
Versuch 8:	378,2	Versuch 15:	71,6
Versuch 9:	342,8		

Bei einem Freiheitsgrad und einem kritischen χ^2 -Wert von 6,63 beträgt die Wahrscheinlichkeit eines statistisch signifikanten Unterschiedes 99%, (24). Das heißt, in 11 von 13 Versuchen ist es mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 99% signifikant, daß die unter dem Einfluß von Dhs phagozytierten Keime intrazellulär einem erhöhtem Abbau unterliegen. Bei einem kritischen χ^2 -Wert von 2,7 besteht für Versuch fünf eine Wahrscheinlichkeit von mehr als 90%, während in Versuch 10 keine Tendenz zu erkennen ist.

Die Ergebnisse sind umso erstaunlicher, wenn man bedenkt, daß Dhs im Serum zu ca 15% in inaktiver Form an Eiweiß gebunden ist (25) und unser Medium 20% Serum enthält. Außerdem ist Dhs bei dem verwendeten pH von 6,5 schätzungsweise zu ca 70% inaktiviert.

(23)

c: Wirkungsmechanismus der Stimulation: Zur Klärung der Ursache der vermehrten Phagozytose führten wir einige Versuche durch, bei denen wir Makrophagen mit 0,3mcg Dhs/ml 120 Minuten (=Einwirkungszeit von Dhs bei den Phagozytoseversuchen) vorbehandelten, dann dreimal mit Medium wuschen und wiederum 90 Minuten mit Escherichia coli 018 inkubierten. Gleichzeitig wurden Kontrollen mit unbehandelten Makrophagen durchgeführt. Es wurden vier Versuche gemacht. Abb. 5 zeigt die Ergebnisse. In allen vier Versuchen besteht in der Phagozytoseaktivität zwischen unbehandelten und behandelten Makrophagen kein wesentlicher Unterschied.

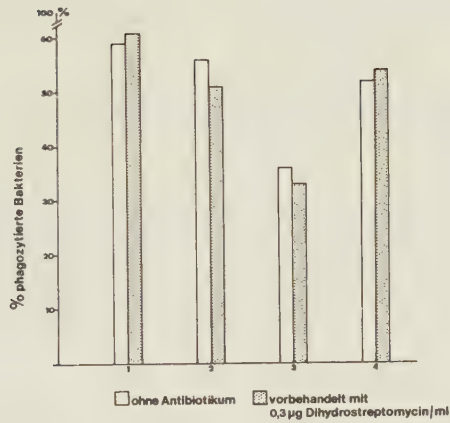


Abbildung 5. Phagozytose von *Escherichia coli* O18 durch normale Makrophagen und Makrophagen die mit 0,3 mcg/ml Dihydrostrptomycin vorbehandelt und vor Zugabe der Keime gewaschen wurden.

IV. Diskussion:

a: Bisherige Berichte über eine Interaktion zwischen Chemotherapie und Phagozytose:

Alle uns bekannten Arbeiten über den Einfluß von Antibiotika auf die Phagozytose benützen nicht Makrophagen sondern Leukozyten oder Vollblut. Die meisten Autoren arbeiten mit Leukozyten in Suspension. Nach einer gewissen Phagozytosezeit machen sie einen Zellausstrich und zählen in einigen hundert Zellen die intrazellulären Keime. Daraus berechnen sie den Quotienten Keimzahl/Leukozyten = Phagozytoseindex. Diese Methode ist unserer Ansicht nach mit zahlreichen Unzulänglichkeiten versehen:

1. Wird meistens nicht berücksichtigt, ob während der Versuchsdauer eine extrazelluläre Proliferation der Keime in den Ansätzen ohne Antibiotikum stattfindet, was auch eine vermehrte Phagozytose zur Folge haben könnte.
2. Kann zwischen den intrazellulär auffindbaren und den tatsächlich phagozytierten Keimen eine erhebliche Diskrepanz bestehen, wie wir in unseren Versuchen zeigen konnten.

Seneca und Peer (26) verwenden als Testkeime *Proteus vulgaris* (461) und *Streptococcus hämolyticus* Lancefield A, beide sind gegen Streptomycin resistent. Unter dem Einfluß hoher Konzentrationen von Streptomycin (2500-250 mcg/ml) beobachteten sie einen erniedrigten Phagozytoseindex und schließen daraus auf eine Suppression der Phagozytose. Unseres Erachtens kann der erniedrigte Phagozytoseindex jedoch genauso gut Ausdruck eines vermehrten intrazellulären Abbaus der phagozytierten Keime sein. Andererseits ist bei den hohen Konzentrationen des relativ zytotoxischen Streptomycins eine Schädigung der Leukozyten nicht auszuschließen, so daß der erniedrigte Phagozytoseindex auch ein Artefakt sein könnte. Weiterhin wurde

nicht auf eine eventuelle extrazelluläre Proliferation in den Ansätzen ohne Antibiotikum geachtet.

Munoz und Geister (27) berichten über einen hemmenden Effekt von Tetracyclinchlorid auf die Phagozytose. Aus der Arbeit geht nicht hervor, ob der benützte Stamm von Staphylococcus albus gegen das verwendete Antibiotikum resistent war. Die verwendeten Konzentrationen (bis zu 1000 mcg/ml) lassen darauf schließen.

Hoeprich und Martin (28) berichten im Gegensatz hierzu, daß Tetracyclin keinen Einfluß auf die Phagozytose eines resistenten Stammes von Staphylococcus albus hat. Für beide Arbeiten gilt die oben genannte Kritik.

Altura et al (29) nehmen als Maßstab für die Phagozytose die Clearance von Kohlenpartikeln. Nach einer viertägigen oralen Gabe von 12 mg Tetracyclin/Tag und Ratte konnten sie eine deutliche Hemmung der Phagozytose beobachten, also in diesem Falle eine Hemmung der phagozytierenden Zellen, da man sich schwer vorstellen kann, daß das Antibiotikum die Eigenschaften der Kohlepartikel verändert. Natürlich ist es schwer diese Ergebnisse mit der Phagozytose von lebenden Mikroorganismen zu vergleichen.

b: Ursache der vermehrten Phagozytose:

Der Wirkungsmechanismus der vermehrten Phagozytose ist von besonderem Interesse. Theoretisch gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Das Antibiotikum aktiviert auf irgendeine Art und Weise die Makrophagen so daß sie eine höhere Phagozytoseleistung haben.
2. Das Antibiotikum tötet die Keime auf Grund seiner unerschwelligen Konzentration zwar nicht ab, aber es schädigt sie geringfügig, so daß sie an Virulenz verlieren und leichter phagozytiert beziehungsweise abgetötet werden.

Verschiedene Gründe sprechen für das letztere:

1. Konnte Bonvertre (30) autoradiographisch nachweisen, daß Dhs in solch niedriger Konzentration und kurzer Einwirkzeit, wie wir sie verwendeten, nicht in Makrophagen diffundiert.
2. Hemmt Dhs die Stoffwechselvorgänge von Zellen (25), so daß es sehr unwahrscheinlich ist, daß es die Phagozytosekapazität von Makrophagen vermehren kann.
3. Konnten wir kürzlich nachweisen, daß Ampicillin (31) den gleichen Effekt wie Dhs hat. Es ist aber sehr unwahrscheinlich, daß ein Penicillinderivat und ein Aminoglykosid, also zwei chemisch ganz verschiedene Substanzen bei Makrophagen ein und den selben Effekt hervorrufen können.
4. Haben die Phagozytose und die Bakterizidie der Makrophagen ganz verschiedene morphologische und Biochemische Äquivalente, so daß anzunehmen wäre, daß bei einer direkten Stimulation der Makrophagen nur eines der beiden Systeme reagieren würde.
5. Konnten wir zeigen, daß Makrophagen, die mit der von uns verwendeten Konzentration von Dhs vorbehandelt und vor Zugabe der Keime gewaschen wurden, gegenüber unbehandelten Makrophagen keine verbesserte Phagozytose zeigen.

Trotzdem ist unserer Ansicht nach das Problem noch nicht ganz geklärt. Weitere Untersuchungen zum Beispiel mit radioaktiv markiertem Dhs könnten neue Erkenntnisse bringen.

Ähnliche Befunde werden auch von anderen Autoren berichtet, die aber Streptomycin und Leukozyten benützten: Lambin und Desvignes (32) konnten zeigen, daß mit subbakteriostatischen Konzentrationen von Streptomycin vorbehandelte *Escherichia coli* Suspensionen, die vor der Inkubation mit den

Leukozyten wieder gewaschen wurden, ein zwei- bis dreifach höherer Phagozytoseindex erreichbar ist, als mit unbehandelten Keimen. Wiederum gilt natürlich, daß der Phagozytoseindex unseres Erachtens keine große Relevanz hat.

Alexander und Good (33) behandelten eine Suspension von *Staphylococcus albus* 502 A mit 25 mcg Streptomycin/ml für fünf Minuten und wuschen die Keime anschließend wieder. Die verwendete Konzentration liegt über der MIC (1,56mcg/ml) des entsprechenden Stammes, hat aber die Keime nicht abgetötet. Dann inkubierten sie die Keime mit Leukozyten und machten nach 5 Stunden eine Osmolyse der Zellen. Bei der anschließenden Keimzählung bestimmten sie die Gesamtheit der intrazellulären und extrazellulären Keime, die von der Menge der intrazellulär abgetöteten Keime abhängig war, da während der Versuchsdauer weder eine Vermehrung noch eine Verringerung der extrazellulären Keime stattfand. Während nach 5 Stunden bei den unbehandelten Kokken 6,5% des Inokulums isoliert werden konnten, waren es bei den Vorbehandelten nur 2,6%. Wurde das Antibiotikum erst nach erfolgter Phagozytose hinzugegeben, so wurden gegenüber den Kontrollen nicht mehr Keime abgetötet.

Im Gegensatz hierzu konnte Cline (34) bei Clofazimine, kein Antibiotikum sondern ein Phenazinderivat, das zur Zeit in der Lepratherapie erprobt wird, zeigen, daß es durch direkte Stimulation des O_2 -Verbrauchs der Makrophagen die Bakterizidie der Zellen erhöht. Vorbehandelte Keime zeigten keinen Effekt, vorbehandelte Makrophagen in etwa 50% der Versuche eine vermehrte Bakterizidie. Unter hypoxischen Bedingungen verlor das Präparat seine Wirkung.

Homes und Mackaness (35, 36) konnten zeigen, daß unter Umständen phagozytierte Keime vor dem Einfluß von Streptomycin geschützt werden können. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu den unsrigen, da in dieser Untersuchung Streptomycin erst hinzugegeben wurde nachdem die Keime phagozytiert worden waren.

Vielmehr stützt es unsere Hypothese, daß Antitbiotika die Phagozytose und Bakterizidie von Makrophagen nicht direkt stimulieren können.

c: Klinische Bedeutung der Ergebnisse:

Bei den, mit üblichen therapeutischen Dosen erreichbaren Blutspiegeln, liegt es oft ganz eindeutig auf der Hand, daß im Gewebe nur unerschwellige Konzentrationen bestehen (37). Es ist daher von klinischem Interesse, daß Keime unter Einwirkung solcher Antibiotikakonzentrationen von Makrophagen vermehrt phagozytiert und intrazellulär abgetötet werden.

Bekanntlich werden Dhs und Streptomycin besonders in der Therapie der Tuberkulose verwandt. Da die Tuberkelbakterien, als fakultativ intrazelluläre Keime sich intrazellulär vermehren können und weil Dhs intrazellulär nicht zur Wirkung gelangt, stellt man sich auch hier die Frage, wie denn das Antibiotikum wirken kann (18). Auch herrschen im tuberkulös-entzündlichen Gewebe oft sehr schlechte Diffusionsbedingungen und ein saurer pH (23), was sicher oft subinhibitorische Konzentrationen zur Folge hat. Vielleicht bewirkt auch hier eine extrazelluläre Schädigung der Keime vor der Phagozytose ein vermehrtes intrazelluläres Abtöten.

Es wäre interessant zu wissen, ob der Synergismus zwischen Phagozytose und Chemotherapie bei allen Antibiotika besteht. Einige klinische Beobachtungen sprechen dafür. So zum Beispiel das seltene Krankheitsbild der septischen Granulomatose, das die neutrophilen Granulozyten betrifft. Kürzlich wurde auch bei Monocyten ein ähnliches Krankheitsbild nachgewiesen. (38) Bei diesem Krankheitsbild können die Phagozyten zwar phagozytieren, aber die Keime werden intrazellulär nicht abgetötet. Alle Antibiotika sprechen hier sehr schlecht an und die Prognose ist infaust.

d: Theoretische Bedeutung der Ergebnisse:

Die Maxime einiger Mikrobiologen, daß das Entscheidende bei der Antibiotikumwirkung die Konzentration am Wirkort sei (39),

scheint nach unseren Ergebnissen nicht ausschlaggebend. Dieses Postulat dürfte das Ergebnis von Überlegungen auf Grund von in-vitro Untersuchungen sein. Mit unserem Modell der Bakterienphagozytose durch Makrophagen, haben wir versucht den in-vivo Bedingungen einen Schritt näher zu kommen. Auch die gegenüber anderen Untersuchungen und der Versuchsanordnung zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) niedrige Keimzahl entspricht mehr den natürlichen Bedingungen.

Als letztes stellt sich natürlich die Frage, ob die durch das Antibiotikum bedingte erhöhte Phagozytose und das sukzessiv vermehrte intrazelluläre Abtöten der Keime auch eine vermehrte Antikörperbildung zur Folge hat. Aufschluß darüber können aber nur Untersuchungen bringen, bei denen der Einfluß der Antibiotika auf die Makrophagenphagozytose von Keimen unter Anwesenheit der Vorläuferzellen einer spezifischen Antikörperproduktion geprüft werden kann, also in einer Zellkultur in der sich auch T- und B-Lymphozyten befinden (40).

V. Zusammenfassung:

In einem in-vitro Testsystem wurde die Phagozytose von E.coli 018 durch Peritonealmakrophagen der Maus gemessen. Dabei wurde fest gestellt, daß bei Zugabe einer unterschwelligen Konzentration von Dihydrostreptomycin, welche die Bakterien in ihrer Vermehrung nicht hemmt, die Keime vermehrt phagozytiert werden. Phagozytierte Bakterien werden zum Teil intrazellulär abgetötet. Bakterien die unter dem Einfluß einer unterschwelligen Antibiotikakonzentration phagozytiert werden, werden in einem höheren Prozentsatz abgetötet als unbehandelte. Makrophagen, die mit Dihydrostreptomycin vorbehandelt und anschließend wieder gewaschen wurden, zeigten gegenüber normalen Makrophagen keine erhöhte Phagozytoseaktivität. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant. Die möglichen Ursachen der vermehrten Phagozytose unter der Einwirkung von Dihydrostreptomycin werden diskutiert. Auch die klinische und theoretische Bedeutung der Ergebnisse werden besprochen.

Literaturverzeichnis

- 1: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 32 (1967), 'Antibodies', (a) Evolution and genetics of antibodies, (b) Differentiation and cellular events.
- 2: Dubos, R.J., Hirsch, J.G.: Bacterial and Mycotic Infections of Man. 4th. Ed., p.190. Lippincott Company, Philadelphia (Pa.), 1965
- 3: Gitlin, D.: Host factors in resistance to infection. XIIth Internat. Congr. of Pediatrics. Official reports. Mexico 1968, Vol. II, p.313. Impresiones Modernas S.A., Mexico 1968.
- 4: Marget, W.: Diskussion. Neue Penicilline. Bemerkungen zur gleichnamigen Arbeit von P.Naumann. Dt. Med. Wschr. 26:1333 (1963).
- 5: Walter, M.L., Heilmeyer, L.: Antibiotikafibel, 3.Aufl., S.600-609. G. Thieme, Stuttgart 1969.
- 6: Walter, M.L., Heilmeyer, L.: Antibiotikafibel, 3.Aufl., S.264-281. G. Thieme, Stuttgart 1969.
- 7: Adam, D.: Studies on the Influence of Host Defence Mechanisms on the Antimicrobial Effect of Chemotherapeutic Agents. I. The Influence of Serum Constituents on the in vitro Effect of Gentamycin and Polymyxin. Int. J. clin. Pharmacol. 2 (1971), 175.
- 8: Metschnikoff, E.: Untersuchungen über die intracelluläre Verdauung bei wirbellosen Thieren. Arb. zool. Inst. Univ. Wien. 5:141 (1883).
- 9: Metschnikoff, E.: Ueber die Beziehung der Phagozyten zu Milzbrandzellen. Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med. (Virchow's). 97:502 (1884).
- 10: Fishman, M., Adler, F.L.: Antibody formation in vitro. II. Antibody synthesis in X-irradiated recipients of diffusion chambers derived from macrophages incubated with antigen. J. exp. Med. 117: 595 (1963).

- 11: Adler, F.L., Fishman, M., Dray, S.: Antibody formation initiated in vitro. III. Antibody formation and allotypic specificity directed by ribonucleic acid from peritoneal exsudate cells. *J. Immunol.* 97: 554 (1966).
- 12: Neter, E., Bertram, L.F., Zak, D.A., Murdock, M.R., Arbesman, C.E.: *J. exp. Med.* 36: 1 (1952)
- 13: Beazley, R.M., Bruce, J.: The effect of free hemoglobin on phagocytosis of *Escherichia coli* by peritoneal macrophages in vitro. *J. Ret. Soc.* 7: 695 (1970).
- 14: Whitby, J.L., Rowley, D.: The role of the macrophage in the elimination of bacteria from the mouse peritoneum. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 40: 358 (1959).
- 15: Rowley, D., Whitby, J.L.: The bactericidal activity of mouse macrophages in vitro. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 40: 507 (1959).
- 16: Rowley, D.: Bactericidal activity of macrophages in vitro against *Escherichia coli*. *Nature* 181: 1738 (1958).
- 17: Pavillard, E.R.J., Rowley, D.: A comparison of the phagocytic and bactericidal ability of guinea pig alveolar and mouse peritoneal macrophages. *Austral. J. exp. Biol.* 40: 207 (1962).
- 18: Patterson, R.J., Youmans, G.P.: Multiplication of *Mycobacterium tuberculosis* within normal and "immune" mouse macrophages cultivated with and without streptomycin. *Infect. Immun.* 1: 30 (1970).
- 19: Ekzemplyarov, O.N.: Effect of tetracycline, chloramphenicol, monomycin and streptomycin on *S. typhimurium* after phagocytosis by macrophages. *Fed. Proc. (Trans. Suppl.)* 25: 309 (1966).
- 20: Huber, H., Fudenberg, H.H.: Die immunologische Funktion von Monozyten und Makrophagen. *Klin. Wschr.* 20: 1061 (1969).
- 21: Degré, M.: Phagocytic and bactericidal activities of peritoneal and alveolar macrophages from mice. *J. med. Microbiol.* 2: 353 (1969).

- 22: Beck,A., Bergner-Rabinowitz,S., Ofek,I.: Effect of pH on in vitro phagocytosis of *Streptococcus pyogenes*. J. of Bacteriology 100: 1204 (1969).
- 23: Mitchell,R.s., Bell,J.C.: Modern chemotherapy of tuberculosis. Antibiotics Monographs No.11. Medical Encyclopedia, Inc., New York, N.Y., (1958).
- 24: Ostle,B.: Statistics in research, 2nd Ed., p.528, The Iowa State Univ. Press (1960).
- 25: Walter,M., Heilmeyer,L.: Antibiotika-Fibel, 3.Auflage, S.245, G.Thieme, Stuttgart (1969).
- 26: Seneca,H., Peer,P.: Effect of antibacterials, antibiotics, enzymes and steroids on phagocytosis. J. of the Am. Geriatrics Soc. 14: 187 (1966).
- 27: Munoz,J., Geister,R.: Inhibition of phagocytosis by aureomycin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75: 367 (1950).
- 28: Hoeprich,P.D., Martin,C.H.: Effect of tetracycline, polymyxin B, and Rifampicin on phagocytosis. Clin. Pharm. Ther. 11: 418 (1970).
- 29: Altura,B.M., Hershey,S.G., Ali,M, Thaw,C.: Influence of tetracycline on phagocytosis, infection, and resistance to experimental shock: Relationship to microcirculation. J. Ret. Soc. 3: 447 (1966).
- 30: Bonventre,P.F., Hayes,R., Imhoff,H.G.: Autoradiographic evidence for the impermeability of mouse peritoneal macrophages to tritiated streptomycin. J. Bact. 93: 445 (1967).
- 31: Adam,D.: Unveröffentlichte Ergebnisse.
- 32: Lambin,S., Desvignes,A.: Influence de quelques substances antibactériennes sur le phénomène de phagocytose. Ann. Inst. Past. 84: 745 (1953).
- 33: Alexander,J.W., Good,R.A.: Effect of antibiotics on the bactericidal activity of human leukocytes. J. Lab. clin. Med. 71: 971 (1968).

- 34: Cline, M.J.: Drug potentiation of macrophage function. *Infect. Immun.* 2: 601 (1970).
- 35: Homes, B., Quie, P.G., Windhorst, D.B., Pollara, B., Good, R.A.: Protection of phagocytosed bacteria from the killing action of antibiotics. *Nature* 210: 1131 (1966).
- 36: Mackaness, G.B.: The phagocytosis and inactivation of staphylococci by macrophages of normal rabbits. *J. exp. Med.* 112: 35 (1960).
- 37: Marget, W., Kienitz, M.: Praxis der Antibiotikatherapie im Kindesalter, S.2-4. G. Thieme, Stuttgart (1969).
- 38: Huber, H.: In-vitro Untersuchungen zur Monocytenfunktion. *Arch. Klin. Med.* 216: 402 (1969).
- 39: Naumann, P.: Neue Penicilline, Indikationen und Grundelemente der therapeutischen Anwendung. *Dt. Med. Wschr.* 4: 165 (1963).
- 40: Gisler R.H., Dukor, P.: A three-cell mosaic culture: In vitro immune response by a combination of pure B- and T-cells with peritoneal macrophages. *Cellular Immunology* (im Druck).

Für die Überlassung des Themas und die Durchsicht der Arbeit möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer.nat. D. Adam herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. W. Marget und Herrn Dr. B. Belohradsky danke ich für zahlreiche Anregungen und freundliche Unterstützung.

Auch Fräulein Siemen möchte ich für Ihre tatkräftige Hilfe danken.

Lebenslauf

Fritz Staber	8 München 70, Konrad Peutingerstr.17
17. Mai 1947	in Rosenheim geboren als Sohn des Kaufmanns Michael Staber und seiner Frau Anna
September 1953 - Juli 1958	Besuch der Volksschule in Rosenheim
September 1958 - Juli 1967	Besuch des Finsterwalder-Gymnasiums ebenda
Oktober 1967	Beginn des Medizin-Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
April 1970	Physikum ebenda
März 1973 - Juni 1973	Staatsexamen ebenda

